

Full documents in russian

(19) RU (11) 2187111 (13) C2

(51) 7 G01N33/48



## (12) DESCRIPTIONS OF INVENTION

To the patent of Russian Federation

Status: operates (of 17.08.2005)

(14) Document date: 2002.08.10

(21) Application number: 99123209/13

(22) Application filing date: 1999.11.02

(24) Date of rights: 1999.11.02

(46) Documents claims only available: 2002.08.10

(71) Applicant information: Kubanskij gosudarstvennyj universitet

(72) Inventor information: Perebora A.V.;  
Rodin I.A.

(73) Grantee (asignee) information: Kubanskij gosudarstvennyj universitet

(98) Mail address: 350040, g.Krasnodar, ul. Stavropol'skaja, 149, Kubanskij gosudarstvennyj universitet, gruppa intellektual'noj sobstvennosti

### (54) METHOD FOR DETERMINING FUNCTIONAL STATE OF MAMMALIAN FOLLICLES

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE: a vessel with a follicle in the solution of incubation medium at pH 7.0-7.3 is hermetically sealed, by pre-removing the air, and kept at  $37.0 \pm 0.5$  C, for an hour. Then it is placed into a gas analyzer of acid-base balance to determine the value of respiration coefficient and if it is equal to 2.0-4.5% the follicle is used for further cultivation in vitro. Finally, during short period of time it is possible to obtain reliable data on practical usefulness of follicles for their cultivation in vitro. The innovation refers to the methods of determining the functional state of follicles the oocytes of which could be used in embryo transfer. EFFECT: higher efficiency of determination.

Full documents in russian

(19) RU (11) 2187111 (13) C2

(51) 7 G01N33/48



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ  
(РОСПАТЕНТ)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Российской Федерации

Статус: действует (по данным на 17.08.2005)

(14) Дата публикации: 2002.08.10

(21) Регистрационный номер заявки: 99123209/13

(22) Дата подачи заявки: 1999.11.02

(24) Дата начала действия патента: 1999.11.02

(46) Дата публикации формулы изобретения:  
2002.08.10

(56) Аналоги изобретения: HAY M.F., GRAN D.C.,  
MOOR R.M. Structural changes occurring during  
atresia in sheep ovarian follicles. Cell and Tissue  
Research, 1979, 169, p.515-529. ОСТРОВСКИЙ  
Д.Н., ГЕЛЬМАН Н.С. Определение  
концентрации кислорода в биологических  
жидкостях методом полярографии с  
неподвижным электродом // Биохимия, 1962,  
№27, с.534. БИОЛОГИЯ, БОЛЬШОЙ  
ЭНЦИКЛОПЕДИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ. - М.:  
Большая Российская энциклопедия, 1998,  
с.190.

(71) Имя заявителя: Кубанский  
государственный университет

(72) Имя изобретателя: Перебора А.В.;  
Родин И.А.

(73) Имя патентообладателя: Кубанский  
государственный университет

(98) Адрес для переписки: 350040,  
г.Краснодар, ул. Ставропольская,  
149, Кубанский государственный  
университет, группа  
интеллектуальной собственности

### (54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФОЛЛИКУЛОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способам определения функционального состояния фолликулов, ооциты которых могут быть использованы при эмбриотрансплантации. Сосуд с размещенным в растворе инкубационной среды фолликулом при pH 7,0-7,3 герметизируют, предварительно удалив воздух, и выдерживают при температуре  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в течение часа, после

чего размещают его в газоанализаторе кислотно-основного равновесия, определяют значение дыхательного коэффициента, и если он равен 2,0-4,5%, то используют фолликул для дальнейшего культивирования *in vitro*. В результате за небольшой промежуток времени получают достоверные данные о практической пригодности фолликулов для культивирования их *in vitro*.

#### ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способам определения функционального состояния фолликулов, ооциты из которых используются для эмбриотрансплантации.

Известны способы определения функционального состояния фолликулов, основанные на применении гистологических исследований (Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. Hay

M.F., Gran D.C., Moor R.M - *Cell and Tissue Research*, 1979, 169, p. 515-529), однако данные способы трудоемки, мало информативны и не лишены субъективности. Для изучения процессов фолликуло- и гаметогенеза, происходящих в яичнике в разные фазы полового цикла, подобный метод отбора фолликулов по степени их атрезии мало пригоден, т.к. трудоемок и нет информации о практической пригодности фолликулов для их культивирования.

Наиболее близким из аналогов к предлагаемому способу является полярографический способ, который получил широкое распространение после введения в практику (в 1956 г.) закрытого Кларковского электрода. В настоящее время он широко используется в клинической и исследовательской практике (Определение концентрации кислорода в биологических жидкостях методом полярографии с неподвижным электродом. Островский Д.Н., Гельман Н.С. - *Биохимия*, 1962, 27, с. 534). При полярографическом способе изучаемый биологический объект помещают в специальную камеру с питательной средой, например ТС-199. С помощью полярографического электрода снимают показания о содержании кислорода в жидкости, окружающей изучаемый биологический объект, в течение 25-30 минут, после чего требуется расшифровка диаграммы.

Существенным недостатком данного способа является его длительность и невысокая степень достоверности получаемых результатов из-за невозможности контролировать pH.

Технической задачей способа является разработка экспресс-способа и получение достоверных данных о практической пригодности фолликулов для культивирования их *in vitro*.

Для решения технической задачи в способе определения функционального состояния фолликулов млекопитающих, включающем изучения физико-химических свойств раствора инкубационной среды, например ТС-199, которая известна из кн. Анджапаридзе О.Г. и др. Культура клетки в вирусологических исследованиях. - М.: Медгиз, 1962, с.28-30, сосуд с размещенным в растворе инкубационной среды фолликулом при pH 7,2-7,3 герметизируют, предварительно удалив воздух, выдерживают его при температуре, равной  $t=37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в течение часа, после чего помещают содержимое сосуда в газоанализатор кислотно-основного равновесия, определяют значение дыхательного коэффициента, и если он равен 2,0-4,5%, то фолликул пригоден для культивирования *in vitro*.

Используемая в способе величина pH 7,0-7,3 является оптимальной для поддержания гомеостаза, температура, равная  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  соответствует температуре тела животного. Сосуд помещают в

термостат на 1 час, т.к. экспериментально установлено, что протекающие в течение этого времени реакции наиболее оптимально свидетельствуют о величине парциальных давлений углекислого газа и кислорода, необходимых для определения значения дыхательного коэффициента и постоянной pH среды культивирования. При значениях коэффициента, равных 2,0-4,5%, независимо от диаметра фолликула его определяют как пригодный для культивирования *in vitro*, т.к. эксперимент показал, что из их числа образуются до 90% яйцеклеток, пригодных для оплодотворения *in vitro*.

Преимущество заявляемого способа заключается в том, что он позволяет за небольшой промежуток времени 2-2,5 часа получать сведения о функциональном состоянии и степени атрезии большой популяции фолликулов, тогда как у прототипа за этот промежуток времени можно исследовать 5-6 фолликулов. Поддержание pH в оптимальных пределах и контроль с помощью газоанализатора кислотно-основного равновесия позволяет повысить достоверность получаемых данных по ДК.

По данным патентной и научно-технической литературы не обнаружена заявляемая совокупность признаков, что позволяет судить об изобретательском уровне предъявляемого технического решения.

Пример конкретного осуществления способа.

В качестве материала исследований использовали фолликулы коровы. Выделенный из яичника фолликул помещали в разовый шприц (объем 2 мл) и закрывали поршнем. Через штуцер для инъекционной иглы с помощью дозатора вводили 1 мл среды ТС-199 с pH 7,2. Поршнем удалили из шприца имеющийся в нем воздух и шприц герметизировали. Затем с интервалом 2 минуты шприцы помещали в термостат при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Исследование инкубационной жидкости в сосуде проводили через час, для чего небольшой объем пробы помещали через капиллярное отверстие в измерительную камеру анализатора кислотно-основного равновесия и газов крови (ВМУ 33/ВСА-2, фирмы "Radiometr"). В течение одной минуты определяли парциальное давление кислорода и углекислого газа в пробе.

$pCO_2=2,28$  мм рт.ст.;  $pO_2=104$  мм рт.ст.

Значение дыхательного коэффициента определяли отношением  $pCO_2/pO_2 \cdot 100\%$ ,  $DK=2,2\%$ .

Предлагаемый способ может быть использован в учебной и лабораторной практике для исследования фармакологических препаратов, эмбриотрансплантации, причем данный способ позволяет за небольшой промежуток времени получать сведения о функциональном состоянии и степени атрезии популяции атравальных фолликулов, выделенных из одного яичника, и охарактеризовать их обменные процессы по значению дыхательного коэффициента.

Практическая значимость способа обусловлена тем, что он используется при воспроизведстве сельскохозяйственных животных, позволяет увеличить выход оплодотворенных яйцеклеток и тем самым повысить число эмбрионов, пригодных для трансплантации.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ определения функционального состояния фолликулов млекопитающих, характеризующийся тем, что изучают физико-химические свойства раствора инкубационной среды, например, TC-199, причем в процессе этого изучения сосуд с размещенным в растворе инкубационной среды фолликулом при  $pH 7,0-7,3$  герметизируют, предварительно удалив воздух, и выдерживают его при температуре, равной  $37^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$  в течение часа, после чего размещают его содержимое в

газоанализаторе кислотно-основного равновесия, определяют парциальное давление кислорода и углекислого газа, по показателям которых рассчитывают значение дыхательного коэффициента, и при его значениях, равных 2,0-4,5%, используют фолликул для дальнейшего культивирования *in vitro*.

## METHOD FOR DETERMINING FUNCTIONAL STATE OF MAMMALIAN FOLLICLES

Patentnummer: RU2187111

Bekendtgørelsesdato: 2002-08-10

Opfinder(e): RODIN I A; PEREBORA A V

Patenthaver(e): KUBAN GU

Ønsket Patent:  RU2187111

Ansøgningsnummer: RU19990123209 19991102

Prioritet(er): RU19990123209 19991102

IPC Klasse: G01N33/48

EC Klasse:

Tilsvarende:

### Sammendrag

biotechnology. SUBSTANCE: a vessel with a follicle in the solution of incubation medium at pH 7.0-7.3 is hermetically sealed, by pre-removing the air, and kept at 37.0 0.5 C, for an hour. Then it is placed into a gas analyzer of acid-base balance to determine the value of respiration coefficient and if it is equal to 2.0-4.5% the follicle is used for further cultivation in vitro. Finally, during short period of time it is possible to obtain reliable data on practical usefulness of follicles for their cultivation in vitro. The innovation refers to the methods of determining the functional state of follicles the oocytes of which could be used in embryo transfer. EFFECT: higher efficiency of determination.

Data fra esp@cenet test databasen - I2